

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09744

研究課題名(和文)腎細胞癌の早期診断及び病勢を反映するバイオマーカーの同定と臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Basic research for identification and clinical application of novel renal cell carcinoma biomarkers which are useful for early diagnosis and prediction for prognosis

研究代表者

伊藤 敬一 (ITO, KEIICHI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・泌尿器科学・教授)

研究者番号：90260091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：包括的高感度転写産物プロファイリング(HiCEP)法と次世代シーケンサー(NGS)を併用した新規の高感度解析法(NGS-HiCEP)により腎癌特異的な遺伝子を探索した。この方法で個々のHiCEPピークに対応する遺伝子を効率的に同定しカタログ化した。癌部と非癌部の遺伝子発現を比較し癌部で5倍以上発現が増加している12遺伝子を同定した。8遺伝子は腎癌との関連が報告され、他の4遺伝子は報告のない新規候補遺伝子であった。リアルタイムPCRにより再現実験を実施し全候補遺伝子で癌部での発現増加が確認された。NGS-HiCEP法は腎癌のバイオマーカー候補を同定する優れた方法であることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では既存の実験方法では見出し得なかった新たな腎癌特異的な遺伝子を検出し、未だ確立されていない非侵襲的診断技術(早期診断や病勢診断など)の開発を目指す学術的独自性のある研究である。NGSを併用したHiCEP法の報告はヒトを含む哺乳類検体において世界初である。本研究の重要な点はNGS-HiCEP法という新規の高感度遺伝子解析法で今まで検出されなかった腎癌マーカーの候補遺伝子が同定されたことである。また、今回は癌部と非癌部の発現量を比較したため、腎癌における早期診断や病勢診断に応用できる可能性がある。さらに4つの新規遺伝子は過去に腎癌との関連性が報告されておらず今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：There have been no specific tumor markers for renal cell carcinoma (RCC). We aimed to identify them using NGS-HiCEP, in which next-generation sequencing (NGS) is combined with high coverage expression profiling (HiCEP) method. We collected cancerous and macroscopically non-cancerous regions from 40 RCC cases. Six cases with clear cell RCC were analyzed by HiCEP. To develop a comprehensive gene expression database for RCC, HiCEP fragments were also sequenced by NGS. Using this database, we identified 12 genes that showed over 5-fold higher expression in cancerous tissues than in non-cancerous tissues in all six RCC cases. We successfully replicated the results for all of these 12 genes by performing real-time PCR with 34 RCC samples. These 12 genes include four novel genes as well as eight known genes whose associations with RCC have been previously reported. Our data indicates NGS-HiCEP to be a very reliable and useful method for identifying novel markers for tumors, including RCC.

研究分野：腎細胞癌

キーワード：腎細胞癌 包括的高感度転写産物プロファイリング 次世代シーケンサー バイオマーカー 腫瘍マーカー リアルタイムPCR

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌（以下腎癌）は発生初期には自覚症状に乏しく、血液検査などの簡便なスクリーニング方法がないため、早期発見には超音波検査などの画像診断に頼らざるを得ない。さらに腎癌と診断された場合にも、術後の再発予測、再発後の病勢の把握、予後予測にヘモグロビン値、好中球数、LDH 値、カルシウム値、CRP 値などの古典的な血液生化学的マーカーが未だに用いられている。当然、特異的な腎癌マーカー同定の試みは長年なされてきたが、マイクロアレイや RNA シークエンスなどの従来の方法では同定が難しいと判断できる。腎癌においても、前立腺癌における前立腺特異抗原 (PSA) のように、検査が簡便で有用な腫瘍マーカーが同定できればその意義は極めて大きい。このような状況のなか、日本発の技術開発として包括的高感度転写産物プロファイリング (HiCEP: High Coverage Expression Profiling) 法が報告され (Fukumura R, et al. *Nucleic Acids Research*, 31:e94; 2003)、mRNA 発現のパターン解析から細胞機能の新たな側面を検出することが可能になった。HiCEP 法は、ATGC の 4 塩基すべての組み合わせ (4 の 4 乗 = 256) に相当する 256 対のプライマーを用いて cDNA を網羅的に増幅することで、高感度にしきも漏れなく mRNA の発現量を測定するものである。その特徴として、すべての mRNA について転写量を定量的に測定することができ、また転写産物の分取も可能であることが挙げられる。したがって、未知の mRNA についての解析も比較的容易である。

我々は 2014 年から、防衛医科大学校倫理委員会の承認のもと HiCEP 法の施行を目的とした手術切除臨床検体（腎細胞癌組織および周囲正常組織）の採取を開始した。そして HiCEP 法の施行を腎細胞癌患者 6 症例（癌部及び非癌部の計 12 検体）にすでに行い、多数の HiCEP ピークを検出した。この 6 症例の HiCEP データを用いて、癌部及び非癌部の比較による HiCEP データの比較や癌部における悪性度による HiCEP データの比較を行うことで腎癌特異的マーカーの同定を目指している。癌部と非癌部の比較では腎癌の早期診断や病勢を反映する腫瘍マーカーが同定できる可能性があり、また悪性度の比較においては再発や予後を予測しうる腫瘍マーカーが同定できる可能性がある。さらに患者の血液細胞（血液細胞全体および白血球細胞）も患者の同意のもと採取し mRNA の収集をすでに行っており、血液細胞を用いた HiCEP 法の施行にも備えている。将来的には、血液細胞を用いた HiCEP 法を行い、血液細胞上で発現が変化するバイオマーカーの同定も目指している。

また HiCEP 法を進めていく中で、HiCEP 法の途中で得られる HiCEP フラグメント (cDNA) を次世代シークエンサー (NGS) で網羅的に解析し、HiCEP 法により得られる HiCEP ピークと遺伝子配列を一致させることにより HiCEP のピークのカタログ化を行うという技術的な改良を行った。この手法により HiCEP ピークの遺伝子の特定が格段に容易となり、癌部で発現が増加する遺伝子や悪性度の高い癌部で発現が上昇する遺伝子の特定が効率化できると想定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、早期診断や病勢を反映する有用なバイオマーカーが存在しない腎癌に対して、腎癌患者の手術検体組織に加え、手術前後に末梢血検体を採取し、HiCEP 法を活用し、かつ次世代シークエンサー (NGS) を組み合わせた新規の高感度解析法により、腎癌特異的な遺伝子や悪性度の高い腎癌で発現が上昇する遺伝子を探索し、効率的に同定し、さらには非侵襲的診断技術の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

3-a) 対象症例

2014 年 6 月より防衛医科大学校病院において手術を受けた腎癌患者 100 名以上の検体採取を行った。検体については、手術において摘出した組織より癌部および肉眼的非癌部の組織、手術前および手術後 1 週間後・手術後約 3 カ月後の血液を収集した。検体の採取にあたっては、インフォームド・コンセントを行い、同意書を取得した。本研究は防衛医科大学校の倫理委員会の承認を得て行った。

3-b) 腎癌組織と血液検体の収集、及び mRNA の抽出

根治的腎摘除術もしくは腎部分切除術を施行された腎癌組織より病理診断に影響しない部位を採取した。腎摘除術を行った組織では癌部のほかに腫瘍から離れた肉眼的非癌部組織も採取した。腎部分切除術の組織では癌とともに切除される肉眼的非癌部組織は少ないが、切除マージンとする 5 mm 以上腫瘍から離れた正常組織から病理診断に影響しない部位を採取した。採取後

は即座に RNA later (Quiagen 社) で処理を行い、6 時間から 12 時間かけて RNA を安定化させた後、-80°C に凍結保存した。組織からの RNA の抽出には、RNeasy® Plus Mini (Quiagen 社) を用いた。血液検体は RNA 抽出のため PAXgene® (Qiagen 社) 採血管を用いた血液採取と、LeukoLOCK® (Thermo Fisher Scientific 社) による白血球分離採取、血漿の採取を行った。

3-c) HiCEP 法の実施

HiCEP 法の詳細について以下に説明する。検体から抽出された RNA をビオチン化した逆転写酵素 (oligo(dT) primer: Thermo Fisher Scientific 社) を用いて二重鎖 cDNA へと変換する。二重鎖 cDNA は 5' 末端側を制限酵素 Msp1 で切断し、Msp1 アダプター

(5' -AATGGCTACACGAACTCGGTCATGACA-3') を結合させる。同様に 3' 側は制限酵素 Mse1 で切断し、Mse1 アダプター (5' -AAGTATCGTACGAGGCGTCCTACTGCG-3') を結合させる。両端に 2 つのアダプターが結合された転写物を HiCEP フラグメントと呼び、以降の実験で発現を解析することが可能である (図 1)。

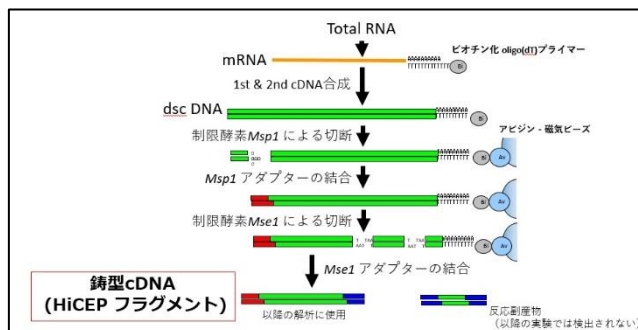


図 1. HiCEP フラグメント

次に、アダプター配列を標的としたプライマーを設計し、HiCEP フラグメントの PCR を行って増幅する。この際にアダプター配列から 2 塩基内側までを標的とするプライマー設計を行うことで、内側 2 塩基の組み合わせに応じた転写物のみを選択して PCR にて増幅することが可能となる (図 2)。

この選択的 PCR の際に用いるプライマーセットは、フォワード側が 16 通り、リバース側が 16 通りとなり、積算すると 256 通りの組み合わせを準備することで、すべての配列の転写物をプライマーセットごとに増幅することができる。最後に、選択的 PCR でプライマーセットごとに増幅した転写物をキャピラリー電気泳動で発現解析を行う。キャピラリー電気泳動で得られたピーク波形は、サンプル間で比較可能であり、ピークの高さで発現量の比較を行う。

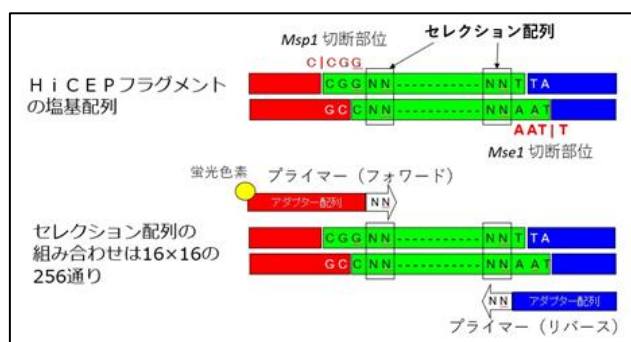


図 2. HiCEP 法のための 256 通りのプライマーセット

淡明細胞型腎細胞癌の 6 症例の組織検体を用いて HiCEP 法による発現解析を行った。6 症例の病期などの臨床情報については表 1 に示す。その 6 症例の癌部および肉眼的非癌部の組織から抽出した RNA を用い、計 12 サンプルの解析を行った。

表 1. HiCEP 法を行った腎細胞癌 6 症例の臨床データ

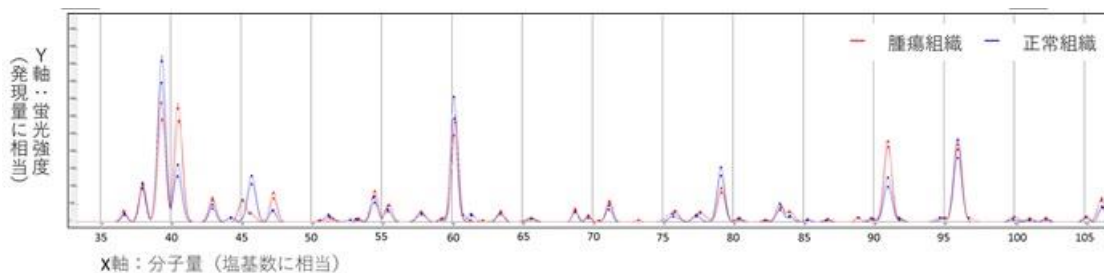
	age	gender	cell type	grade	Fuhrman grade	pT stage	N (0 or 1)	M (0 or 1)	v (0 or 1)	ly (0 or 1)
1	65	F	Clear cell	G2	2	1b	0	0	0	0
2	59	M	Clear cell	G2	2	1b	0	0	1	0
3	66	M	Clear cell	G2>G3	2	2a	0	0	1	0
4	65	M	Clear cell	G2>G3	3	3a	0	1	1	0
5	82	M	Clear cell	G3	4	3a	0	0	0	0
6	67	F	Clear cell	G3>G2	4	3b	1	1	1	0

N; リンパ節転移の有無, M; 遠隔転移の有無, V; 静脈浸潤の有無, Ly; リンパ管浸潤の有無

3-d) キャピラリー電気泳動

選択的 PCR された HiCEP フラグメントは、プライマーセットごとに ABI Prism 310 (Thermo Fisher Scientific 社) にてキャピラリー電気泳動を行う。選択的 PCR で蛍光色素を結合させているため、蛍光強度により発現量を計測することができる。また泳動距離や速度に応じて、分子量すなわち塩基数を計測することができる。これにより縦軸に発現量、横軸に塩基数を表すピーク波形を描くことが可能となり、ピークの高さを検体間で比較することができる (図 3)。

図 3. キャピラリー電気泳動



3-e) HiCEP フラグメントの網羅的解析および HiCEP ピークのデータベース構築

ピークの塩基配列の決定を行うため、NGS を用いて HiCEP フラグメントの網羅的解析を行う。シーケンサーは Thermo Fisher Scientific 社の Ion PGM を用いた。Pre-amplification を行った HiCEP フラグメントを、Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてライブラリ作成し、チップには Ion 318 Chip Kit v2 を用いた。HiCEP フラグメントは断片化することなくライブラリ作成を行った。HiCEP フラグメントはすべて両端に共通するアダプター配列が結合されている。またキャピラリー電気泳動の結果から、使用した選択的プライマーの種類、予想される発現量、予想される塩基数などの情報が得られている。これらの情報をもとに、NGS にてえられた塩基配列のデータをそれぞれ HiCEP ピークに振り分けていくことで、HiCEP ピークの塩基配列の決定しカタログ化を行う。これにより、腎癌組織の癌部、肉眼的非癌部における遺伝子発現データベースの構築を行う。

3-f) 再現解析 (リアルタイム PCR)

収集した腎癌検体組織から RNeasy® Plus Mini (Quiagen 社) を用いて RNA の抽出を行った。BioAnalyser (Agilent 社) にて RNA 濃度や quality check を行い、RNA Integrity Number が 7 以上、RNA 濃度が 10 ng/μL 以上となった 34 検体を用いた。NGS を併用した HiCEP 法による解析において抽出した遺伝子のうち、腎癌特異的マーカーの候補遺伝子に関して SYBR green 法による発現解析を行った。候補遺伝子に関してリアルタイム PCR のプライマー設計を行った。リアルタイム PCR の際の逆転写酵素として、SuperScript IV VIL0 Master Mix with ezDNase Enzyme (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。SYBR green 法の反応試薬として PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。

4. 研究成果

4-a) HiCEP 法による発現解析の結果

腎癌患者 6 症例の癌部及び肉眼的非癌部の計 12 検体において、HiCEP 法による発現解析を行った。その結果、1 検体当たり 58,478 個の HiCEP ピークを認めた。プライマーセットごとに平均すると 1 プライマーセットあたり 228 個の HiCEP ピークを認めた。Subio Platform において、癌部において非癌部より 5 倍以上発現が増加する 16 個の HiCEP ピークが同定された。図 4 にはその例を示した。

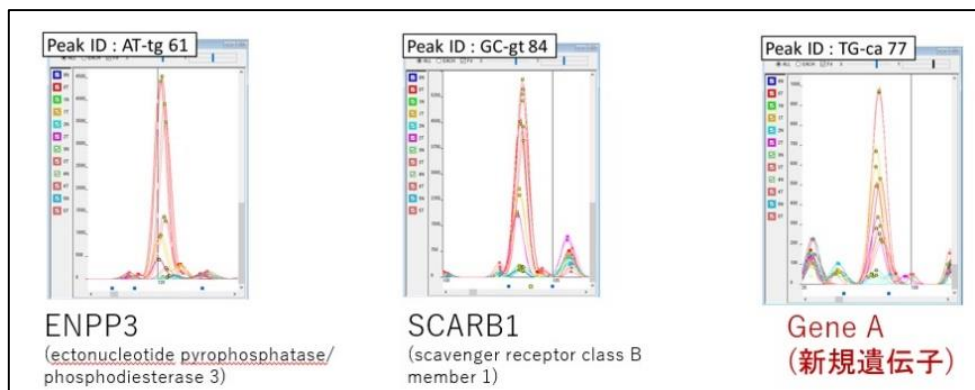


図 4. 発現量の比較において抽出した 5 倍以上発現増加する HiCEP ピークの例

赤色の曲線が症例 1 の癌部、黄色が症例 2 の癌部、青色が症例 1 の非癌部というように色分けをしている。暖色系が癌部の発現量、寒色系が非癌部のものである。6 症例すべてで癌部が非癌部より 5 倍以上発現が上昇している peak を選出し、カタログ化してある sequence database で

配列を決定した。その配列を用い、BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により遺伝子の同定を行った。図 4 に示す ENPP3 と SCARB1 などの遺伝子はすでに腎癌との関連が報告されている遺伝子である。Gene A のように腎癌との関連性が未報告の遺伝子においても発現が上昇するものが散見された。

4-b) NGS による塩基配列の同定と関連遺伝子の検索

表 2. 発現量の比較により同定された候補遺伝子

Primer set	peak ID	sequence length	gene
TA-tt	34	35	CA9 (carbonic anhydrase 9)
GC-gt	84	101	SCARB1 (scavenger receptor class B member 1)
GA-at	208	302	EGLN3 (egl-9 family hypoxia inducible factor 3)
AT-tg	61	88	ENPP3 (ectonucleotide)
GT-ct	51	62	ESM1 (endothelial cell specific molecule 1)
GC-ac	52	56	STC2 (stanniocalcin 2)
CT-tt	161	203	SEMA5B (semaphorin 5B)
CA-ca	105	182	ANGPT2 (angiopoietin 2)
AT-tt	25	28	Gene A
AC-aa	148	177	Gene B
GC-cc	20	29	Gene C
TG-ca	77	97	Gene D

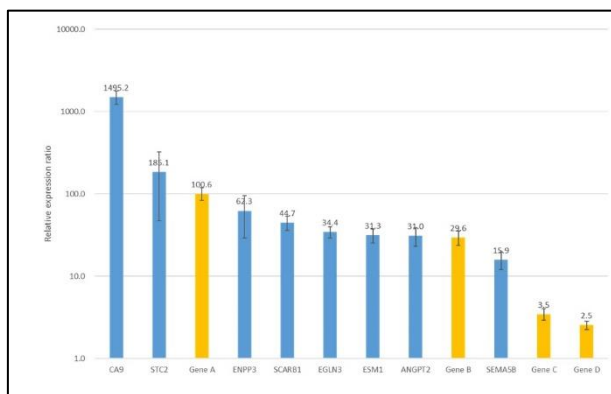
HiCEP ピークの比較により、癌部において肉眼的非癌部よりも 5 倍以上発現していた 16 個のピークについて NGS 解析結果をもとに塩基配列の同定と関連する遺伝子について検索を行った。NGS 結果のデータベースから、16 個のうち塩基数が 400 以上であったもの 2 個、及び塩基数が 30 未満と短いもの 2 つを除く、12 個について塩基配列の同定が

可能であった。塩基配列をもとに遺伝子検索データベースである BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて関連する遺伝子を検索した。8 個の遺伝子については過去に腎癌との関連が報告された遺伝子であり、carbonic anhydrase 9 (CA9)、stanniocalcin 2 (ST2)、ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (ENPP3)、scavenger receptor class B member 1 (SCARB1)、egl-9 family hypoxia inducible factor 3 (EGLN3)、endothelial cell specific molecule 1 (ESM1)、angiopoietin 2 (ANGPT2)、semaphorin 5B (SEMA5B)であった。残りの 4 個は腎癌との関連がまだ示されていない新規の腎癌関連遺伝子であった (表 2)。

4-c) リアルタイム PCR による再現解析

HiCEP 解析未使用の 34 症例の腎癌組織検体から抽出した mRNA を用いて SYBR Green による再現解析を行った (図 5)。既知の 8 遺伝子及び未報告の 4 遺伝子 (黄色のバー) すべてにおいて癌部で発現が有意に上昇しており、NGS-HiCEP の高い再現性を確認することができた。各遺伝子において肉眼的非癌部と比べて癌部において何倍の発現量となっているかを求めた。既知遺伝子の 8 個については、CA9 が 1495.2 倍、STC2 が 185.1 倍、ENPP3 が 62.3 倍、SCARB1 が 44.7 倍、EGLN3 が 34.4 倍、ESM1 が 31.3 倍、ANGPT2 が 31.0 倍、SEMA5B が 15.9 倍であった。新規遺伝子 4 個については、Gene A が 100.6 倍、Gene B が 29.6 倍、Gene C が 3.5 倍、Gene D が 2.5 倍であった。12 個すべての候補遺伝子について、非癌部と比べて癌部において発現が増加している結果となった (図 5)。

図 5. リアルタイム PCR による発現解析



4-d) まとめ

本研究では HiCEP 法に NGS) を組み合わせた新規の NGS-HiCEP 法を用い腎癌に特異的に発現が増加する遺伝子を探索した。HiCEP を用い約 5 万 8 千個のピークを得ることができ NGS-HiCEP 法で個々の HiCEP ピークのカタログ化を行った。非癌部と比べ癌部において 5 倍以上発現が増加している 12 遺伝子を同定した。既知の 8 遺伝子は CA9、SCARB1、EGLN3、ENPP3、ESM1、STC2、SEMA5B、ANGPT2 であり、他の 4 遺伝子は過去に腎癌との関連が報告されていない新規の候補遺伝子であった。この 12 遺伝子においてリアルタイム PCR による再現実験を実施し、全候補遺伝子において癌部における発現増加が確認できた。本研究において NGS-HiCEP 法が腎癌特異的なバイオマーカーの候補を同定する方法として効率的で優れた手法であることが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川口真、松尾洋孝、荒木良子、清水聖子、高尾幹也、中山昌喜、北村陽典、湯野川春信、安倍真澄、四ノ宮成祥、伊藤敬一
2. 発表標題 HiCEP法と次世代シーケンサーを併用した腎癌組織の遺伝子発現データベースの構築と腎癌マーカーの同定.
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawaguchi M, Matsuo H, Araki R, Shimizu S, Takao M, Nakayama A, Kitamura Y, Abe M, Ito K, Shinomiya N.
2. 発表標題 Development of a gene expression database of renal cell carcinoma cases by NGS-combined HiCEP to identify tumor markers.
3. 学会等名 AACR (American Association for Cancer Research) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiko Shimizu, Hiroataka Matsuo, Makoto Kawaguchi, Akiyoshi Nakayama, Mikiya Takao, Yosuke Kitamura, Yujiro Tsujita, Yusuke Kawamura, Keiichi Ito, Nariyoshi Shinomiya
2. 発表標題 The use of NGS-HiCEP build an extensive renal cell carcinoma gene expression database for identifying tumor markers
3. 学会等名 2020年日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroataka Matsuo, Ryoko Araki, Seiko Shimizu, Makoto Kawaguchi, Akiyoshi Nakayama, Yosuke Kitamura, Yusuke Kawamura, Kazuki Maehara, Masumi Abe, Keiichi Ito, Mayumi Hoshikawa, Junji Yamamoto, Yoji Kishi, Nariyoshi Shinomiya
2. 発表標題 Development of a gene expression database of pancreatic ductal adenocarcinoma cases by NGS-combined HiCEP to identify tumor markers
3. 学会等名 AACR (American Association for Cancer Research) annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yosuke Kitamura, Akiyoshi Nakayama, Yujiro Tsujita, Makoto Kawaguchi, Mikiya Takao, Seiko Shimizu, Keiichi Iwaya, Yusuke Kawamura, Yu Toyoda, Hitoshi Tsuda, Nariyoshi Shinomiya, Yoji Kishi, Keiichi Ito, Hirotake Matsuo
2. 発表標題 NGS-HiCEP法による淡明細胞型腎細胞癌と膵管腺癌の新規腫瘍マーカー候補の同定
3. 学会等名 2021年日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kitamura Y, Nakayama A, Tsujita Y, Kawaguchi M, Takao M, Shimizu S, Iwaya K, Kawamura Y, Toyoda Y, Tsuda H, Shinomiya N, Kishi Y, Ito K, Matsuo H
2. 発表標題 NGS-HiCEP法による淡明型腎細胞癌・膵管腺癌の腫瘍マーカー候補の同定
3. 学会等名 第6回Liquid Biopsy学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村陽典、中山昌喜、辻田裕二郎、川口真、高尾幹也、清水聖子、中岡博史、岩屋啓一、斎藤俊行、豊田優、河村優輔、高田雄三、湯野川春信、荒木良子、安倍真澄、津田均、四ノ宮成祥、松尾洋孝、伊藤敬一
2. 発表標題 NGS-HiCEP法による腎細胞癌の腫瘍マーカー候補の同定
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松尾 洋孝 (MATSUO HIROTAKA) (00528292)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・分子生体制御学・教授) (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------